اثر تنش های دمایی بر پراکسیداسیون لیپیدها در دو گونه مرکبات شمال ایران

مجید گلوانی (۱)، رضا فتوحی قزوینی (۲)، وهب جعفریان (۱) و ریحانه سریری (۱)
۱- بخش بیوشیمی دانشکده علوم ۲- بخش باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

چکیده

مرکبات برای افزایش تحمل سرما زدگی به یک دوره سازگاری به سرما نیاز دارند. این فرایند منجر به تجمع پروتئین هایی می شود که سنتز آنها در دماهای پایین افزایش می یابد. از مهمترین این پروتئین ها، پروتئین های ضد یخ (AFPs) می باشند که توسط گیاهانی که در معرض دمای پایین قرار گرفته اند و یا در آب و هوای سرد زندگی می کنند جهت تحمل سرما و اجتناب از انجماد، تولید شده که با بلورهای یخ در میانکنش می باشند. خصوصیات عملکردی و ساختاری پروتئین های ضد یخ آنها را قادر می سازد تا بوسیله کاهش دمای انجماد، تعدیل کردن و یا مانع شدن از رشد کریستالهای یخ، ممانعت از تبلور مجدد و محافظت غشایی سلول در برابر آسیب ناشی از سرما، از موجودات زنده محافظت نمایند. اما یکی از اثرات و آسیب های بارز سرما پراکسیداسیون چربی های غشایی(Lipid peroxidation) می باشد. پراکسیداسیون چربی های غشایی به تجزیه اکسیداتیو لیپیدی اشاره دارد و فرآیندی است که در آن رادیکالهای آزاد، الکترون را از لیپید های غشایی پلاسمایی دریافت کرده و به سلول ازاین طریق آسیب می رسانند. در مرکبات برای شناسایی مکانیسم های تحمل استرس دمای پایین، مطالعه میزان پراکسیداسیون لیپیدی و بررسی وجود پروتئین های ضد یخ از اهمیت خاصی برخورداراند. از این رو در این پژوهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و وجود پرونئین ضد یخ (AFP) در تیمار های دمایی (۲۰، صفر، ۳-، ٦- و۹-) در دو گونه مقاوم نارنج و سیترنج مرکبات مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه سنجش میزان مالون دی آلدئید(MDA) به عنوان اندیکاتور یا نشانگر میزان پراکسیداسیون لیپیدی می باشد، نتایج حاصل از بررسی سنجش میزان MDA در این تحقیق نشان داد که میزان MDA یا همان پراکسیداسیون لیپیدی در هر دو گونه با کاهش دما، افزایش کمی داشته و علاوه بر این در هر دو گونه مقاوم نارنج و سیترنج مرکبات در اثر اعمال دماهای زیر صفر پروتئین ضد یخ با وزن مولکولی تقریبا ۲۳ کیلو دالتون برای مقابله با استرس یخ زدگی تولید شده است.

مقدمه

گیاهان برای تحمل به سرما زدگی به یک دوره سازگاری به سرما نیاز دارند. این فرایند منجر به تجمع و افزایش سنتز پروتیئن های خاصی در دماهای پایین می شود. بعضی از این پروتیئن ها از جمله دهیدرین ها (پروتیئن های که در متابولیسم کربو هیدرات نقش دارند)، تنظیم کننده های کیناز و پروتئین های محافظت کننده در مقابل سرما درون سلولی می باشند. ویژگی های عملکردی پروتئین های محافظت کننده در برابر سرما حفاظت ازپروتئین های درون سلولی و غشاء در طی فرآیند انجماد- ذوب می باشد (۱). به علاوه, ۳ نوع پروتئین خارج سلولی نیز در طی سازگاری سرمایی تجمع می یابند. پروتئین های تغییر دهنده دیواره سلولی، پروتئین های مربوط به بیماری زایی که گیاهان را در مقابل

عوامل بیماری زا محافظت می کند وپروتئین های ضدانجماد یا ضد یخ (Antifreeze proteins, AFPs) که توسط ارگانیسم هایی که در آب و هوای سرد زندگی می کنند جهت تحمل سرما و اجتناب از انجماد تولید می شوند و با اتصال به بلور یخ از تشکیل آن ممانعت می کنند. این پروتئین ها در طیف وسیعی از گونه های اقلیم سرد از ماهی تا گیاهان، حشرات و باکتریها یافت شده اند (۲). گوناگونی گونه هایی که این پروتئین ها را تولید می کنند به همراه گوناگونی که در خود این پروتئین ها وجود دارد باعث به وجود آمدن طیف وسیعی از پروتئین های ضد یخ در اندازه ها و عملکردهای مختلف شده است. خصوصیات عملکردی و ساختاری پروتئین های ضد یخ آنها را قادر می سازد تا بوسیله کاهش دمای انجماد، تعدیل کردن و یا مانع شدن از رشد کریستالهای یخ، ممانعت از تبلور مجدد و محافظت غشایی سلول در برابر آسیب ناشی از سرما، از موجودات زنده محافظت نمایند. با وجودی که AFPs در سال ۱۹۷۰کشف شده اند ولی مکانیسم هایی که از طریق آنها AFPs روی رشد کریستال یخ اثر می گذارد هنوز هم در حال بررسی می باشد (۳).

هم چنین، در دماهای پایین سرعت فتوسنتز کاهش یافته و در نهایت متوقف می شود در نتیجه انرژی نورانی جذب شده در واکنش های فتوسنتزی به کار نرفته و در برگ سرمازده، در دامنه وسیع آسیب زای واکنش های اکسیداسیون نوری شرکت می کند که یکی از اثرات و آسیب های بارز سرما پراکسیداسیون چربی های غشایی (Lipid peroxidation) می باشد (٤). پراکسیداسیون چربی های غشایی به تجزیه اکسیداتیو لیپیدی اشاره دارد و فرآیندی است که در آن رادیکال های آزاد، الکترون را از لیپید های غشایی پلاسمایی در یافت کرده و به سلول ازاین طریق آسیب می رسانند. این فرآیند با مکانیسم واکنش زنجیری رادیکال آزاد انجام گرفته و اغلب به هنگام افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع اتفاق می افتد.

به دلیل اهمیت و فراوانی گونه های مختلف مرکبات در شمال ایران و ارتباط AFP با مقاومت سرمایی گیاه و یافتن مسیری جدید برای بهبود و افزایش بهره وری مرکبات، هدف از این تحقیق بررسی وجود AFP و پراکسیداسیون چربی های غشایی در برگ انواع مرکبات می باشد.

مواد و روش‌ها

شرایط تنش سرمایی : برای بررسی وجود پروتئین ضد یخ (AFP) و پراکسیداسیون چربی های غشایی در برگ مرکبات، نیاز به گیاهچه های ۱۰-۲۰ سانتی متری دو گونه مرکبات نارنج و سیترنج بود که بدین منظور از موسسه تحقیقات مرکبات در رامسر تهیه شده و بعد از انتقال به آزمایشگاه در مخلوط ماسه و پرلیت به نسبت ۱ : ٤ کاشته شدند. برای اعمال سرما، گیاهان مورد نظر به دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲۰درجه سانتیگراد و رطوبت ۷۵٪ و طول روز ١٦ ساعت منتقل شدند. در دستگاه در طی ۲ روز دمای دستگاه از ۲۰ درجه سانتیگراد به ترتیب به صورت۱۵،۱۰، ۵ ، ۳، درجه سانتیگراد کاهش یافت تا برای اعمال دماهای زیر صفر به تدریج سازگار شوند. سپس دماهای صفر و زیر صفر ۳- ، ٦- و ۹- روی گیاهچه ها اعمال شد تا برای کارهای استخراج مهیا شوند.

استخراج : به منظور استخراج عصاره سلول برگ مرکبات درهاون چینی قرار گرفت و نیتروژن مایع به آن اضافه شد، سپس سائیده شدند تا کاملا هموژنیزه شوند. برگهای هموژنیزه بلافاصله وزن شده و به میکروتیوپ های ۱/۵ سی سی با ذکر مشخصات منتقل گردیدند. حدود ۵۰۰ میکرومولار (نیم میلی لیتر) از بافرحاوی بافر فسفات ۲۰ میلی مولار و

بتامرکاپتو اتانول ۲۰ میلی مولار در داخل میکروتیوپ حاوی برگهای هموژنیزه اضافه کرده و سپس در سانتریفیوژ یخچال دار در دمای صفر درجه سانتیگراد با دورrpm ۱٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند . بعد از سانتریفیوژ ،محلول رویی را با دقت هر چه تمام برداشته و به میکروتیوپ های دیگری انتقال داده و با ذکر مشخصات به طریق قبل دوباره سانتریفیوژ کرده و محلول رویی برداشته شد.

تخلیص : برای تخلیص AFP از روش کروماتوگرافی FPLC و الکتروفورز به روش SDS- PAGE ناپیوسته استفاده شد. به این صورت که از عصاره سلولی استخراج شده برگ مرکبات حدود ۱ – ۲ میلی لیتر به دستگاه FPLC تزریق کرده و بعد از جمع آوری آنها در میکروتیوپ ، با توجه به پیک های روی کروماتوگرام ، عصاره مربوط به پیک ها را برای تایید خلوص الکتروفورز انجام گرفت.

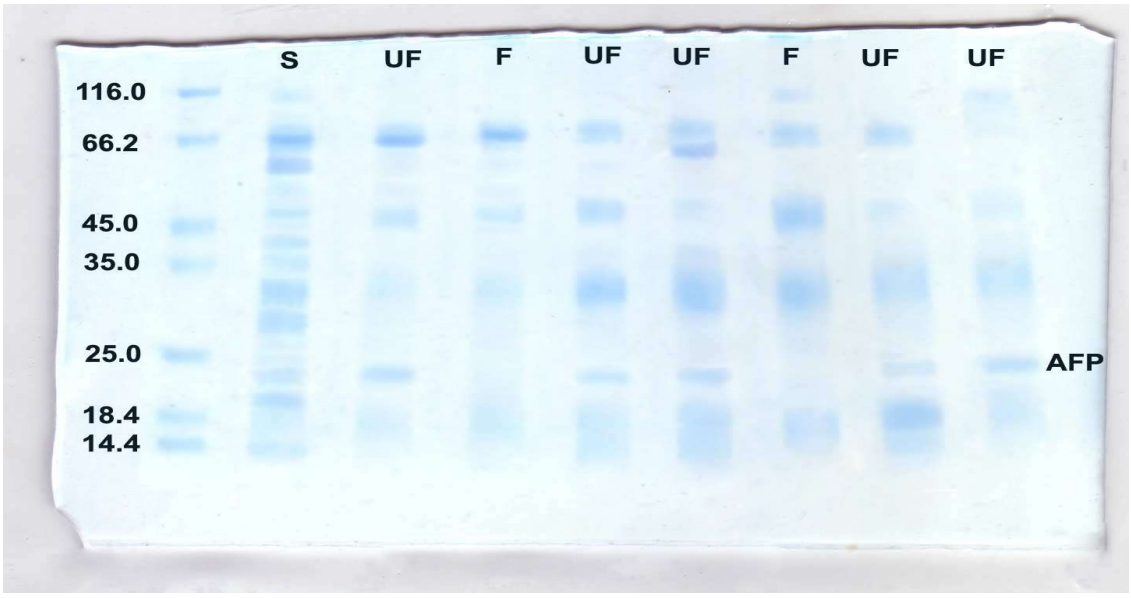
سنجش پراکسیداسیون چربی ها: این سنجش با استفاده از تیو باربیتوریک اسید (TBA) و تری کلرواستیک اسید (TCA) انجام شد. ابتدا ۰/۵ گرم TBA در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و از طرفی ۲۰ گرم TCA نیز در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر آب شد . سپس دو محلول با هم مخلوط شده و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانیده شد و به عنوان استوک بافر مورد استفاده قرار گرفت. ٦۰۰ میکرولیتر از استوک بافر به همراه ٦۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی آنزیم در سل نمونه ریخته و در سل Blank نیز فقط ۱۰۰۰ میکرولیتر از استوک بافری ریخته شد. سلول با پارافیلم مسدود شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس بلافاصله در حمام ظرف یخ قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد با دورrpm ۱۰۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول رویی برداشته شده و جذب آن در ۵۳۲ نانومتر و ٦۰۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت برای بیان نتیجه مقدار جذب ٦۰۰ نانومتر از جذب ۵۳۲ نانومتر کم کرده تقسیم بر ۱۵۵ تقسیم شد تا نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی به دست آید.

$$\frac{A_{532} - A_{600}}{155 mM^{-1} cm^{-1}}$$

نتایج و بحث

با توجه به اینکه تولید پروتئین های ضد یخ یکی از مکانیسم های مهم در مقابله با یخ زدگی در گیاهان یخ زده می باشد و همچنین پراکسیداسیون لیپید های غشایی از اثرات و آسیب های بارز سرما زدگی و یخ زدگی است. بررسی های انجام گرفته در این تحقیق بر روی دو گونه نارنج و سیترنج نشان دادند که AFPs در اثر اعمال دماهای زیر صفر در این دو گونه از مرکبات تولید می شوند. همچنین مشخص شد که با اعمال دماهای زیر صفر پراکسیداسیون لیپید های غشایی نیز اتفاق می افتد.

بعد از چندین بار تخلیص AFP با استفاده از کروماتوگرافی FPLC مشخص شد که بعضی از نمونه های جمع آوری شده از FPLC بر خلاف بقیه بعد از قرار گرفتن در فریزر به مدت چندین ساعت یخ نمی زنند. برای اطمینان تعدادی از نمونه ها ی یخ زده و نزده را روی ژل الکتروفورز برده شده و مشخص شد که نمونه های یخ نزده در ناحیه تقریبا ۲۳ کیلو دالتون باندی را می دهند که این باند در نمونه های یخ زده مشاهده نمی شود.



شکل ۱ – ژل اکریل آمید سیترنج بعد از FPLC

(S= sitrange F= freezed UF= unfreezed)

شکل ۲ – ژل اکریل آمید نارنج بعد از FPLC

(N= narenge F= freezed UF= unfreezed)

نتایج حاصل از پراکسیداسیون لیپید های غشایی نشان دادند که این عمل در هر دو گونه با کاهش دما ، طبق جدول زیر افزایش می یابد.

گونه	دما (^{0}C)	A_{532} (nm)	A_{600} (nm)	$\frac{A_{532}-A_{600}}{155\ mM^{-1}cm^{-1}}$
نارنج	20	0.257	0.192	0.0004
	0	0.725	0.516	0.0014
	-3	1.164	0.751	0.0027
	-6	1.557	0.982	0.0036

سیترنج	0.005	1.125	1.896	-9
	0.0009	0.094	0.234	20
	0.0015	0.275	0.506	0
	0.0024	0.445	0.821	-3
	0.0033	0.592	1.112	-6
	0.0042	0.716	1.362	-9

همان طور که گفته شد، AFP در موجودات freeze - tolerant متعددی از قبیل ماهی، حشرات، باکتریها و گیاهان تولید می شود . از جمله گیاهانی که در آنها AFP هنگام قرار گرفتن گیاه در دماهای سرد تولید می شود، می توان به گندم زمستانی، انواع جو، گوجه فرنگی و از گیاهان درختی هلو، سیب و مرکبات اشاره کرد(۵). طی یک سری آزمایشات معلوم شد که در تنش های سرمایی مرکبات، یک سری از mRNA های مخصوصی و بعضی از پلی پپتیدها در citrus species تجمع می یابند. CUCOR19 mRNA که شبیه یکی از پروتئین های دهیدرین پونسیروس می باشند و از خود فعالیت ضد یخی نشان می دهد ، در citrus unshiu طی آزمایشی کلون شد و مشخص گردید که این پروتئین در برگ های این درخت بعد از اعمال سرما تجمع می یابد(٦). برخی از پروتئین های به خصوصی که از نواحی آپوپلاست گندم زمستانی بعد از قرار گرفتن این گیاه در معرض دمای سرد خالص شد و مشخص گردید که این پروتئین ها از خود خواص ضد یخی نشان می دهند و دمای تشکیل یخ را کاهش می دهند (۷). فعالیت AFP بوسیله Thermal hysteresis و یا مورفولوژی کریستالهای یخ رشد کرده در حضور AFP اندازه گیری می شود. شکل کریستالهای یخ به غلظت AFP و فعالیت ویژه آن بستگی دارند (۸).

AFP ماهی ها به تنهایی به ۵ نوع تقسیم می شوند که تقریبا همه آنها در ساختارهایشان بخش هایی از α-helices ، β-strand و β– turn را دارند. تا به امروز ساختارهایی برای تعدادی ازAFP ماهی ها شناسایی شده اند. AFP ماهی به طور قابل ملاحظه ای در ساختارشان تنوع دارند. AFP حشرات به ۳ نوع تقسیم می شوند که به طور قریب بصورت β-helix هستند و یک فولد نسبتا نادری در میان پروتئین وجود دارد. پروتئین های ضد یخ ماهی thermal hysteresis (TH) را در دامنه ۱/۵– ۰/۷ در جه سانتیگراد نشان می دهند در حالیکه عصاره خام حشرات برعکس ماهی ها TH را در ۱۰– ۵ در جه سانتیگراد نشان می دهند (۹).

همان طور که گفته شد، در طی سرمازدگی ممکن است ضمن شروع آسیب، شدت تنفس بالا رود. در نتیجه در اثر این کار با افزایش تنفس، جذب اکسیژن در ساعات اولیه سرما بسیار بالامی رود در حالیکه خروج دی اکسید کربن (CO_2)به مقدارکمتری افزایش می یابد، به عبارتی در اثر سرمازدگی میزان تنفس بالاتر رفته و سطح اکسیژن زیاد می شود وبه احتمال زیاد این امکان وجود دارد که اکسیژن به فرم اکسیژن های فعال از جمله سوپراکسید و مواد اکسید شده تک اکسیژنه دربافت سرمازده تبدیل می شود (۱۰). سوپراکسید یک اکسنده بسیار قوی است و میتواند لیپیدها و اسیدهای چرب غیر اشباع را پراکسید نمایدکه این منجر به خسارت سریع وبرگشت ناپذیری غشایی می شود. علاوه بر این سطح پراکسید و مالون دی آلدئید در طی چرخه انجماد – ذوب افزایش می یابدو اینها نیز باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می شود (۱۱).

منابع

[1] Atıcı, O¨., Nalbantog˘ lu, B., 1999a. Apoplastic proteins associated with the coldacclimation process in leaves. Bio-Science Research Bulletin15: 55–60.

[2] Antikainen M, Griffith M (1997) Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. Physiol Plant 99**:** 423–432

[3] DeVries AL (1986) Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. Methods Enzymol 127**:** 293–303

[4] Liu, J. et al (1997) Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid; Analyt. Biochem. 245, 161-166.

[5] Griffith, M., Antikainen, M., 1996. Extracellular ice formation in freezing- tolerant plants. Advanced Low-Temperature Biology 3, 107–139.

[6] Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 571–599.

[7] Yu, X.-M., Griffith, M., 2001. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. Physiologia Plantarum 112, 78–86.

[8] Duman, J.G., 1994. Purification andcharacteri zation of a thermal hysteresis protein from plant, bittersweet nightshade Solanum dulcamara. Biochimica et Biophysica Acta 1206, 129–135.

[9] Hansen, T. N., and Baust, J. G. (1988) Differential scanning calorimetric analysis of antifreeze protein activity in the common mealworm, *Tenebrio molitor. Biochim. Biophys. Acta* 957**,** 217–221.

[10] McKersie, B.D. 1991. The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants. pp.107-118. In: Eds. E. Pell, and K. Steffen. *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*. Am. Soc. of Plant Physiol

[11] Raven EL (2000). "Peroxidase-catalyzed oxidation of ascorbate. Structural, spectroscopic and mechanistic correlations in ascorbate peroxidase". *Subcell. Biochem.* 35: 317–49.